Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Hahn

BIOCHEMISCHE MODIFIKATION DER ZELLMEMBRAN LISTERIA MONOCYTOGENES–IMMUNER T–ZELLEN: MÖGLICHE BEDEUTUNG FÜR DIE INFEKTABWEHR

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Matthias Respondek
Berlin

1984

UNIV.
LIBRARY
FREIBURG

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0068

Druck:
Kopie Print
Unter den Eichen 57
1000 Berlin 45 - Lichterfelde-W.
Telefon 030/8 31 24 82

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Leiter : Prof.Dr.med. H.Hahn

" Biochemische Modifikation der Zellmembran Listeria monocytogenes - immuner T - Zellen : Mögliche Bedeutung für die Infektabwehr "

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Matthias Respondek
Berlin

Referent : Priv.Doz.Dr.rer.nat.S.H.E.Kaufmann

Korreferent : Prof.Dr.med.H.Tiedemann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 24.7.1984

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Biologische Bedeutung endständiger Kohlenhydratgruppen	5
1.2	Modelle der Zell - Zell - Interaktion nach Membranmodifikation	7
1.3	Experimentalmodell	9
1.4	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Materialien	12
2.1.1	Versuchstiere	12
2.1.2	Bakterien	12
2.1.3	Medien und Zusätze	12
2.1.4	Chemikalien und andere Materialien	12
2.1.5	Geräte	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Listerienwachstum und -infektion	14
2.2.2	Gewinnung Listerien - immuner Peritonealexsudat - T - Lymphozyten	15
2.2.3	In vitro - Modifikation der Zellmembran	17
2.2.4	Analyse der molekularen Veränderungen	18
2.2.5	Zell - Transfer	18
2.2.6	Allergische Reaktion vom verzögerten Typ	19
2.2.7	Untersuchung des Migrationsverhaltens	19
2.2.8	Statistische Auswertung	20

3	Ergebnisse	22
3.1	Adoptiver Transfer von Schutz gegen eine Listerieninfektion	22
3.1.1	Einfluß der Membranmodifikation mit Perjodat und Borhydrid auf den adoptiven Schutz	23
3.1.2	Einfluß der Membranmodifikation mit Neuraminidase, Galaktoseoxidase und Borhydrid auf den adoptiven Schutz	24
3.1.3	Vergleich zwischen Behandlung mit Neuraminidase oder Perjodat bzw. zwischen Behandlung mit Neuraminidase + Galaktoseoxidase oder Neuraminidase + Perjodat	27
3.2	Konzentrationsabhängigkeit der gezeigten Effekte	28
3.2.1	Variation der Perjodat - Konzentration	29
3.2.2	Variation der Neuraminidase - Konzentration	31
3.2.3	Variation der Galaktoseoxidase - Konzentration bei konstanter Neuraminidase - Konzentration	31
3.3	Infektion 24 Stunden nach Zelltransfer	35
3.4	Transfer einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ gegen Listerienantigen	37
3.5	Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	39
3.6	Einfluß der Membranmodifikation auf das Migrationsverhalten von Peritonealexsudat - T - Lymphozyten	39
3.7	Analyse der molekularen Veränderungen	42
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ca.	circa
d	dies , Tag
DTH	" delayed type hypersensitivity " , allergische Reaktion vom verzögerten Typ
FCS	" fetal calf serum " , fötales Kälberserum
Gal	Galaktose
Gox	Galaktoseoxidase
h	hora(e) , Stunde(n)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LD_{50}	letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
log	Logarithmus zur Basis 10
Nase	Neuraminidase
Ns	Neuraminsäure(n)
PBS	" Phosphate buffered saline " , Phosphat - gepufferte Salzlösung
Petls	Peritonealexsudat - T - Lymphozyten
s.c.	subcutan

1 Einleitung

Durch die Glykokalix sind tierische Zellen von einer äußeren Kohlenhydratschicht überzogen. Diese Kohlenhydrate sind Bestandteile von Glykoproteinen der Zellmembran. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung besitzen Glykoproteine große biologische Bedeutung, insbesondere auch unter immunologischen Gesichtspunkten (Übersicht in : Hughes, 1975; Reutter et al., 1982).

Das terminale Ende der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen wird häufig von Neuraminsäuren (Ns) gebildet , präterminal findet sich oft Galaktose (Gal) (Übersicht in Köttgen et al., 1979). Durch biochemische Modifikation dieser Strukturen kann ihre Bedeutung in vivo und in vitro untersucht werden. Geläufige Methoden sind Abspaltung der Ns mittels Neuraminidase (Nase) sowie oxidative Veränderungen der Ns selbst durch Perjodat (JO_4^-) oder der nach ihrer Abspaltung frei werdenden Gal durch Galaktoseoxidase (Gox) (Woodruff und Gessner, 1969; Novogrodski und Katchalski , 1972, 1973; Ashwell und Morell, 1974).

1.1 Biologische Bedeutung endständiger Kohlenhydratgruppen

Grundlegende Untersuchungen zur biologischen Bedeutung

endständiger Kohlenhydratgruppen stammen von Ashwell und Morell (1974). In Experimenten mit radioaktiv markierten Plasmaproteinen stellten diese Wissenschaftler fest, daß Glykoproteine nach Abspaltung von Ns nicht mehr frei in der Blutbahn zirkulieren, sondern in der Leber über eine Bindung an Hepatozyten abgefangen und anschließend intrazellulär abgebaut werden. Dieser Effekt beruht darauf, daß Gal - Reste frei werden (vgl.1.3). Eine Veränderung der Gal, z.B. durch Oxidation, bewirkt wieder normales Rezirkulationsvermögen. Bereits das Freiwerden einer sehr geringen Anzahl von Gal - Resten hebt die Zirkulationsfähigkeit weitgehend auf. Dies gilt für die meisten, aber nicht für alle der untersuchten Glykoproteine. Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß unter natürlichen Bedingungen die Abspaltung von Ns ein wesentlicher Mechanismus für die Plasmahalbwertszeit von Glykoproteinen sein dürfte.

Auch die Lymphozyten - Rezirkulation wird durch Membranmodifikation verändert : Nase - behandelte Lymphozyten akkumulieren in der Leber; nach 24 Stunden (h) ist wieder ein normales Verteilungsmuster nachzuweisen (Woodruff und Gessner , 1969). JO_4^- - behandelte Lymphozyten werden in der Leber festgehalten, dieser Effekt ist spontan nicht reversibel, kann jedoch durch Reduktion mit Borhydrid (BH_4^-) aufgehoben werden (Zatz et al., 1972). Als Angriffspunkt der JO_4^- - Oxidation werden die endständigen Ns angenommen; es wurde gefolgert, daß die Rezirkulationsfähigkeit von Lymphozyten maßgeblich von deren Oxidations - Reduktionszustand abhängt (Zatz et al.,

1972).

Ausführliche Untersuchungen liegen vor über das Verhalten von T - Lymphozyten, die eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (im englischen Sprachraum als " delayed type hypersensitivity " , DTH , bezeichnet) gegen Schaferythrozyten vermitteln (Kaufmann et al., 1981) : Nase - Behandlung führt zu spontan reversibler Anhäufung in der Leber und vorübergehender Reduktion der DTH. Dieser Effekt wird durch zusätzliche Oxidation mit Gox verstärkt und erscheint weitgehend irreversibel, ohne daß eine Anhäufung dieser Zellen in Leber und Milz nachweisbar ist. JO_4^- - Behandlung bewirkt permanenten Verlust der Fähigkeit, DTH zu übertragen. Beide Oxidationseffekte sind durch Reduktion mit BH_4^- reversibel, es werden wieder Kontrollwerte (JO_4^- + BH_4^-) bzw. Werte wie nach Nase - Behandlung allein (Nase + Gox + BH_4^-) erreicht. Umgekehrt zeigen unbehandelte Zellen und Zellen nach Nase - Behandlung nach einem Intervall von mindestens 24 h eine Anreicherung im peripheren Entzündungsherd, während die Anreicherung von Zellen nach oxidativer Membranmodifikation deutlich geringer ist.

1.2 Modelle der Zell - Zell - Interaktion nach Membranmodifikation

Für die verstärkte Zell - Zell - Interaktion nach oxi-

dativer Behandlung postulierten Novogrodski und Katchalski (1973) die Bildung Schiffscher Basen zwischen den neu entstandenen Aldehydgruppen und freien Aminogruppen. Durch eine intensivere Bindung der Zellen aneinander soll nach diesem Modell eine ausgeprägtere Interaktion möglich werden.

Ashwell und Morell (1974; Ashwell et al., Morell et al., 1974) zeigten die spezifische Bindung von Glykoproteinen nach Nase - Behandlung an Hepatozyten. Ein aus der Hepatozytenmembran isoliertes Protein besitzt nicht nur Bindungseigenschaften, sondern führt auch zur mitogenen Transformation Nase - behandelter Lymphozyten (Novogrodski und Katchalski, 1977). Kolb et al. (1978) fanden ebenfalls eine spezifische Bindung Nase - behandelter Lymphozyten an Hepatozyten und isolierten ein Protein mit mitogenen Eigenschaften, dessen Identität mit dem von Ashwell und Morell beschriebenen Protein (1974) postuliert wurde.

Auch in anderem Zusammenhang wurden ähnliche Proteine beschrieben, z.B. spezifische Bindung Nase - behandelter Erythrozyten an Makrophagen (Müller et al., 1981; Schlepper - Schäfer et al., 1980).

Offenbar existieren also spezielle Biomembranstrukturen mit rezeptorähnlichen Eigenschaften für nach Ns - Abspaltung freiwerdende, ursprünglich präterminale Gal - Reste von Glykoproteinen; Abspaltung oder Oxidation der Gal - Reste beseitigt diese Bindung. Rein formal besitzen diese Proteine

Lektin - Eigenschaften (Ashwell et al., Morell et al., 1974).

Die Bedeutung dieser rezeptorähnlichen Strukturen z.B. für die Erythrozytenmauserung liegt auf der Hand , während über die Bedeutung z.B. einer Lymphozytenakkumulation in der Leber unter Bedingungen wie während einer Infektion wenig bekannt ist.

1.3 Experimentalmodell

Die Untersuchungen der Bedeutung endständiger Membranzucker für spezifische T - Zellfunktionen der Infektabwehr erfolgten am Modell der experimentellen Listeriose der Maus (Mackeness, 1962, 1969).

Listeria monocytogenes (L. monocytogenes) ist ein fakultativ intrazellulär persistierender Keim (wie z.B. auch Tuberkelbakterien; Übersicht in Hahn und Kaufmann, 1981). Im Gegensatz zur Antikörper - vermittelten Immunität gegenüber typischen Eitererregern, z.B. grampositiven und gramnegativen Kokken, ist die protektive Immunität gegen fakultativ intrazelluläre Keime an T - Lymphozyten gebunden. Das Modell benutzt also die experimentelle Listeriose als Paradigma einer T - Zell abhängigen Immunantwort; Kriterium dieser Immunantwort ist das Keimwachstum in Leber und Milz des infizierten Tieres. Von

zentraler Bedeutung ist dabei der T - Zelltransfer : durch Übertragung Listerien - spezifischer Peritonealexsudat - T - Lymphozyten (Petls) auf nicht immune Tiere ist eine adoptive Immunisierung gegen eine gleichzeitige Listerieninfektion möglich. Während die antibakterielle Immunität eine T - Zellfunktion ist, erfolgt die Abtötung der Erreger durch Makrophagen. Dazu ist eine enge Interaktion zwischen T - Lymphozyten und Makrophagen erforderlich. Dies führt zur Sekretion von Lymphokinen, welche mononukleäre Phagozyten anlocken und aktivieren. Ausdruck dieser Interaktion ist die Entwicklung spezifischer Granulome. T - Lymphozyten sind in der Lage, die Zirkulation zu verlassen und in Entzündungsherde einzuwandern (North und Spitalny, 1974). Dabei kann eine homogene T - Zellpopulation sowohl Schutz als auch eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ vermitteln (Kaufmann und Hahn, 1982).

1.4 Fragestellung

Das Modell der experimentellen Listeriose bietet die Möglichkeit, für die Infektabwehr fakultativ intrazellulär persistierender Bakterien erforderliche Faktoren unter standardisierten Bedingungen in vivo zu analysieren. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung endständiger Membrankohlenhydrat-

moleküle spezifischer T - Lymphozyten bei der Infektabwehr untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden,

- welchen Einfluß eine Membranmodifikation mit Nase, Gox, JO_4^- und BH_4^- auf das adoptive Immunisierungsvermögen und die Auslösbarkeit einer DTH - Reaktion hat und
- ob das Migrationsverhalten membranmodifizierter Zellen beeinflußt wird (Untersuchung durch radioaktive Zellmarkierung) und wie sich dies auf die Infektabwehr auswirken könnte.

Schließlich sollte die biochemische Analyse der Modifikationen erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

- (C57Bl/6xDBA/2)F_1 - Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen aus eigener Zucht des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin

2.1.2 Bakterien

- L. monocytogenes, Stamm EGD (Serotyp 1 + 2a)

2.1.3 Medien und Zusätze

- Tryptikase - Soya - Bouillon und -Agar für Bakterienkulturen : Difco, Detroit, USA
- Earl's Medium 199 : Seromed, München
- Dulbecco's Phosphat - gepufferte Salzlösung (" phosphate buffered saline " , PBS) : Serva, Heidelberg
- Fötales Kälberserum (" fetal calf serum " , FCS) : Flow - Laboratories, Köln
- Heparin (Thrombophob ^{R}), 5000 E/ml : Nordmarkwerke, Hamburg

2.1.4 Chemikalien und andere Materialien

- Neuraminidase aus Vibrio cholerae, 1 U/ml : Behring AG, Marburg

- Galaktoseoxidase aus Polyporus circinatus : Sigma - Chemicals, München
- Caseinhydrolysat : Merck, Darmstadt
- Borhydrid : Merck, Darmstadt
- Perjodat : Merck, Darmstadt
- Radioaktives Chrom ($Na_2{}^{51}CrO_4$), spezifische Aktivität 0,5 mCi/ml : Amersham Buchler, Braunschweig
- Türk's Lösung : Merck, Darmstadt
- Trypanblau : Bayer, Leverkusen
- Glaswolle : Heraeus GmbH, Hanau
- Nylonwatte, Leukopak leukocyte Filter : Fenwal Laboratories, Deerfield, USA

2.1.5 Geräte

- Kühlzentrifuge : Hettich, Tuttlingen
- Wasserbad : Braun Melsungen AG, Melsungen
- Brutschrank : Heraeus, Stuttgart
- CO_2 - Brutschrank : National Heinicke Company, Portland, USA
- Homogenisator : Braun Melsungen AG, Melsungen
- Schnelltaster zur Messung der Fußballendicke : Kröplin GmbH, Schlüchtern
- Auto - Gamma - Spectrometer : Packard, Warrenville, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Listerienwachstum und -infektion

L.monocytogenes wurde durch ständige Tierpassagen virulent gehalten. Mit dem Milzhomogenat einer infizierten Maus wurde eine Tryptikase - Soya - Bouillon beimpft. Aus der nach acht- bis zwölfstündiger Bebrütung sichtbaren Schlierenbildung ließ sich die Keimzahl abschätzen (zwischen 5×10^7 und 1×10^9 /ml). Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (mit Aqua dest. bzw. 0,9 % NaCl im letzten Schritt) erfolgte die Infektion der Tiere. Die Immunisierungsdosis betrug 1×10^4 Listerien / 0,2 ml für Zelldonoren und 5×10^4 Listerien / 0,2 ml zur Infektion von Zellrezipienten. Die LD_{50} lag bei etwa 1×10^5 Listerien / Maus.

Zur Kontrolle der tatsächlichen Infektionsdosis diente:

a) Inokulumkontrolle : Ausstreichen der zur Infektion verwendeten Listeriensuspension in entsprechender Verdünnung auf Tryptikase - Soya - Agar und Auszählung der Kolonien nach Bebrütung für 24 h bei 36 °C.

b) 15 - Minuten - Wert (bei Zelltransfer - Experimenten) : Organentnahme 15 min nach Transfer und Infektion und Nachweis der Listerienzahl entsprechend 2.2.5 .

2.2.2 Gewinnung Listerien - immuner Peritonealexsudat-T - Lymphozyten

Prospektive Zelldonoren wurden mit 1 x 10^4 Listerien / Maus intravenös (i.v.) infiziert. Sechs Tage (d) nach Infektion wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 2 ml einer 5 % Caseinhydrolysatlösung (in 0,9 % NaCl, pH 7,4) Peritonealexsudate induziert. Achtundvierzig h später wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und der Peritonealraum mit je 3 ml eiskaltem, kompletten Medium (Earl's Medium 199, supplementiert mit 1 % FCS und 5 E Heparin / ml, pH 7,4) ausgespült. Die Ausbeute betrug maximal 2 - 3 x 10^7 Zellen / Tier.

Das Peritonealexsudat wurde 10 min bei 1000 Umdrehungen / min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in wenig Medium resuspendiert. Anschließend wurden T - Lymphozyten angereichert:

a) Reinigen über Glaswolle : sterilisierte, mit Glaswolle gestopfte 20 ml - Spritzen wurden vor Gebrauch mit 20 ml Medium gespült; die Glaswolle wurde mit Medium bedeckt und mit Zellsuspension beschickt (ca. 4 x 10^8 Zellen / Säule). Nach 10 min wurden die Säulen mit 50 ml Medium langsam ausgespült.

Das Reinigen über Glaswolle diente der Verringerung der Makrophagenzahl, die Zellausbeute betrug 45 % der ursprünglichen Zellzahl. Das Eluat enthielt noch eine geringe Anzahl

Makrophagen (Beurteilung im Mikroskop).
Die Schutzwirkung Glaswolle - gereinigter Zellen war ca. eine log - Einheit besser als die ungereinigter Zellen (bei gleicher Zellzahl).

Alle Schutzversuche erfolgten mit Glaswolle - gereinigten Zellen.

b) Reinigen über Nylonsäulen (Julius et al., 1973) : sterilisierte, mit 1,4 g Nylonwatte gestopfte 10 ml - Spritzen wurden vor Gebrauch mit 50 ml PBS und anschließend mit 50 ml PBS + 5 % FCS gespült, inkubiert (60 min, 37 ^{o}C , 5 % CO_2) und nochmals mit PBS + 5 % FCS gespült. Jede Säule wurde mit maximal 1 x 10^8 Zellen (in 1 bis 1,5 ml Medium + 5 % FCS) beschickt und inkubiert (45 min, 37 ^{o}C, 5 % CO_2). Anschließend wurde jede Säule mit 50 ml Medium + 5 % FCS (37 ^{o}C) tropfenweise eluiert. Die Zellausbeute betrug 10 % der ursprünglichen Zellzahl.

Das Reinigen über Nylonsäulen diente der Anreicherung von T - Lymphozyten (Julius et al., 1973). Über Nylonsäulen gereinigte Zellen wurden zur Untersuchung des Migrationsverhaltens verwandt : eine unspezifische Beeinflussung der Radioaktivitätsmessungen durch andere Peritonealexsudat-Leukozyten sollte vermieden werden.

Nach Zentrifugation wurden die Zellen gezählt und die Zahl toter Zellen bestimmt. Als Vitalitätskriterium diente der mikroskopische Nachweis der Exklusion von Trypanblau. Die Zahl

toter Zellen lag nach dem Reinigen bei 1 % ; sie stieg nach den verschiedenen In vitro - Behandlungen auf bis zu 10 % an.

2.2.3 In vitro - Modifikation der Zellmembran

In PBS suspendierte, gereinigte Zellen (1×10^7 /ml) wurden mit JO_4^- , BH_4^- , Nase , Gox und Kombinationen dieser Substanzen inkubiert (JO_4^- + BH_4^- , Nase + Gox , Nase + JO_4^- , Nase + Gox + BH_4^-). Falls nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationen unter den in Tabelle 1 genannten Bedingungen. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mehrfach resuspendiert. Danach wurde zweimal gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Behandlung mit Nase + Gox erfolgte gleichzeitig, alle übrigen Mehrfachbehandlungen erfolgten sukzessive.

Tabelle 1. Behandlung Listerien - immuner T - Zellen mit Nase, Gox, JO_4^- und BH_4^-. Inkubationsbedingungen und verwendete Konzentrationen

Behandlung	Konzentration	Inkubationszeit	Temperatur
JO_4^-	0,5 mMol/l	10 min	Zimmertemperatur
BH_4^-	5 mMol/l	10 min	Zimmertemperatur
Nase	0,1 U/l	60 min	37 °C
Gox	1 U/l	60 min	37 °C

2.2.4 Analyse der molekularen Veränderungen

Gereinigte Zellen wurden wie oben beschrieben inkubiert und Überstände (Abspaltprodukte) und Sedimente (Zellen) wurden quantitativ mit dem Perjod - Thiobarbitursäure - Mikroassay und qualitativ dünnschicht- und gaschromatographisch analysiert. Diese Analyse wurde von Herrn Prof.Dr. Schauer , Kiel, ausgeführt, dem ich dafür zu Dank verpflichtet bin.

2.2.5 Zell - Transfer

Über Glaswolle gereinigte und mit JO_4^-, BH_4^-, Nase und Gox behandelte Listerien - immune Zellen (s.2.2.3) wurden auf normale Tiere übertragen, welche anschließend mit L. monocytogenes i.v. infiziert wurden (1×10^7 Zellen und 5×10^4 Listerien / Maus). Nach 48 bzw. 72 h wurden Leber und Milz entnommen, mit Aqua dest. in einem Endvolumen von 10 ml homogenisiert, in 1 : 10 - Verdünnungsschritten auf Tryptikase - Soya - Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 ^{o}C bebrütet. Die Zahl der danach gewachsenen Listerienkolonien diente als Maß für die Zahl der Listerien / Organ.

Neben dem Transfer unterschiedlich behandelter Zellen erfolgte als Positivkontrolle stets der Transfer nicht behandelter Zellen, als Negativkontrolle diente das Listerienwachs-

tum in infizierten, nicht immunisierten Mäusen. Der übertragene Schutz wurde nach folgender Formel berechnet :

log Protektion =

log Listerien(Negativkontrolle) - log Listerien(Zellempfänger).

2.2.6 Allergische Reaktion vom verzögerten Typ

Bei Untersuchungen zur adoptiven DTH gegen Listerienantigen wurden Petls wie oben beschrieben behandelt und auf nicht - immune Empfängertiere transferriert. Jedes Versuchstier erhielt gleichzeitig 0,05 ml Listerienantigen subcutan (s.c.) in eine Hinterpfote. Nach 24 h wurde die Reaktion durch Bestimmung der Fußschwellung im Vergleich zur nicht injizierten Seite abgelesen (Ablesung mit dem Schnelltaster in Einheiten von 0,1 mm). Als Antigen diente ein lösliches Listerienprodukt, das im Labor zur Verfügung stand (Kaufmann et al., 1979).

2.2.7 Untersuchung des Migrationsverhaltens

Durch radioaktive Zellmarkierung mit ^{51}Cr wurde das Migrationsverhalten verschieden behandelter T - Zellgruppen

untersucht. Es wurde mit über Nylonsäulen gereinigten Zellen gearbeitet. Über Glaswolle gereinigte Zellen zeigten ein vergleichbares, jedoch weniger deutlich ausgeprägtes Migrationsverhalten. Dies dürfte auf dem größeren Prozentsatz an kontaminierenden Leukozyten beruhen.

Nach unterschiedlicher In vitro - Inkubation wurden die Zellen in Medium (+ 5 % FCS) mit 20 - 40 μu Ci ^{51}Cr / ml Suspension für 1 h im Wasserbad inkubiert (1 x 10^8 Zellen, 37 ^{o}C, mehrmaliges Aufschütteln). Nach dreimaligem Waschen wurde auf 1 x 10^7 Zellen /ml eingestellt und ein Aliquot (20 μl) als 100 % - Wert entnommen. Jedes Versuchstier erhielt 0,2 ml der Zellsuspension (5 x 10^6 Zellen) und 5 x 10^4 Listerien i.v. Leber und Milz wurden nach 1, 24 und 48 h entnommen; nach Entnahme aller Organe wurde die in ihnen enthaltene Radioaktivität bestimmt und als Prozentsatz der ursprünglich verabreichten Aktivität berechnet.

2.2.8 Statistische Auswertung

Dargestellt wird jeweils ein repräsentatives Experiment. Jede Gruppe besteht aus mindestens fünf Tieren. Die Abbildungen zeigen Mittelwert und Spannweite jeder Gruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem

Wilcoxon - Test für verbundene Stichproben (Rangsummentest) (Geigy, Wissenschaftliche Tabellen 1975; Immich, 1974). Als signifikant werden Unterschiede bezeichnet, deren Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 Adoptiver Transfer von Schutz gegen eine Listerieninfektion

Sechs d nach Listerieninfektion wurden Peritonealexsudate induziert, zwei d später die Zellen gewonnen, gereinigt und je 1 x 10^7 Zellen auf Mäuse, die gleichzeitig mit 5 x 10^4 Listerien i.v. infiziert wurden, transferriert.

Im 15 min - Wert fand sich ein Verhältnis der Listerienzahl Leber : Milz von ca. 10 : 1. Wegen des stärkeren Listerienwachstums in der Milz kam es innerhalb 48 bis 72 h zu einer Angleichung bzw. einem Überwiegen (bis zu einer log - Einheit) des Keimwachstums in der Milz.

In Abhängigkeit von der gewählten Infektionsdosis wurden die höchsten Keimzahlen nach 72 h (10^6 - 10^8 Listerien /Organ) gefunden. Durch die im infizierten Tier einsetzende spezifische Immunität war das Keimwachstum danach rückläufig. Die Schutzwirkung unbehandelter, immuner Zellen betrug in der Leber ungefähr drei log - Einheiten. In der Milz wurde ein stärkerer Schutz von etwa vier log - Einheiten erreicht. Diese Daten stimmen weitgehend mit den von Mackeness (1969) publizierten Befunden überein.

Im Folgenden wurden die Petls einer In vitro - Mem-

branmodifikation unterzogen und die Schutzfähigkeit 48 und 72 h nach Transfer ermittelt.

3.1.1 Einfluß der Membranmodifikation mit JO_4^- und BH_4^- auf den adoptiven Schutz

Petls wurden mit JO_4^-, BH_4^- oder JO_4^- + BH_4^- inkubiert. In der Leber zeigte sich nach JO_4^- - Inkubation kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle (unbehandelte, immune Petls), der erreichte Schutz war jedoch regelmäßig geringer (Abb.1). In der Milz kam es zu einer signifikanten Abnahme der Schutzwirkung ($p < 0,01$). Nach Reduktion der JO_4^- - behandelten Zellen mit BH_4^- war die Abnahme der Schutzleistung vollständig reversibel : es wurde die gleiche Schutzleistung wie in derKontrollgruppe erreicht. BH_4^- allein zeigte keinen Einfluß. Die Differenzen in der Schutzwirkung zwischen den einzelnen Gruppen blieben über 72 h unverändert erhalten.

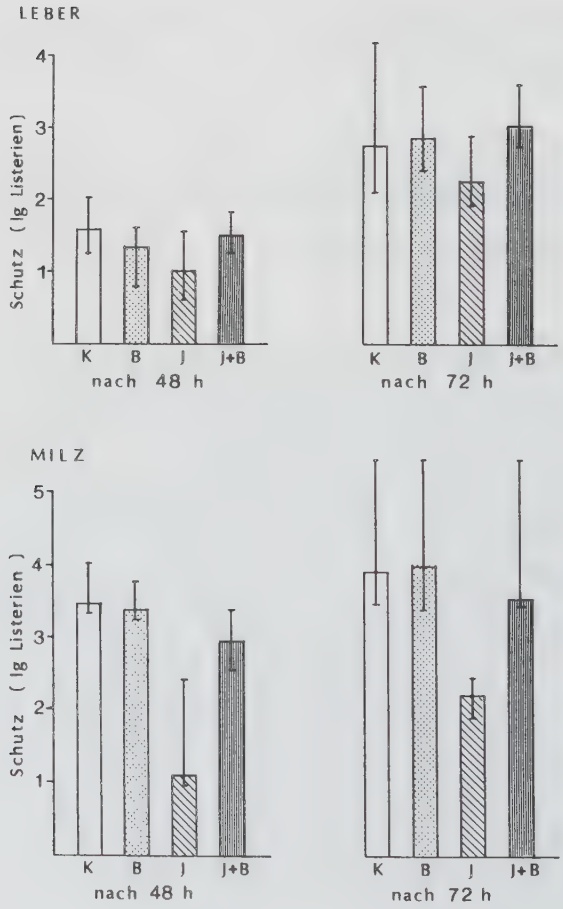

Abb.1. Einfluß der Membranmodifikation von Petls mit JO_4^- und BH_4^- auf den adoptiv übertragenen Schutz in Leber und Milz nach 48 bzw. 72 h. JO_4^- - Behandlung verringerte den Schutz in der Milz signifikant ($p < 0,01$).
In vitro - Reduktion mit BH_4^- führte wieder zu ungehindertem Schutzverhalten.
B, BH_4^- ; J, JO_4^- ; B + J, BH_4^- + JO_4^- ; K, Kontrolle

3.1.2 Einfluß der Membranmodifikation mit Nase, Gox und BH_4^- auf den adoptiven Schutz

Petls wurden mit Nase, Gox, Nase + Gox und Nase + Gox + BH_4^- inkubiert. Nase - Behandlung führte in der Leber zu keiner signifikanten Schutzänderung, der nach 72 h erreichte Wert war jedoch - ähnlich wie nach JO_4 - Behandlung - regelmäßig geringer als in der Kontrollgruppe. In der Milz schützten Nase - behandelte Zellen signifikant schlechter ($p < 0,01$).

Eine wesentlich stärkere Abnahme der Schutzleistung als Nase - Behandlung allein bewirkte Inkubation mit Nase + Gox : der Schutz betrug in der Milz nur noch ca. eine log - Einheit, auch in der Leber war der Schutz signifikant schlechter ($p < 0,01$) (Abb.2). Durch anschließende Reduktion mit BH_4^- waren die durch Gox hervorgerufenen Veränderungen vollständig reversibel : die Schutzwirkung entsprach der von Zellen, die nur mit Nase behandelt worden waren. Gox - Behandlung allein hatte keinen Einfluß.

Der Versuch, durch Inkubation mit Emetin die Resynthese der Ns zu unterbinden und dadurch eventuell eine Verstärkung des Nase - Effektes zu erzielen, gelang nicht (Daten nicht dargestellt). Die in der Literatur (Brinckerhoff und Luhrin, 1974) angegebene Konzentration von 0,05 mMol /l Emetin zeigte keine Wirkung. Bei einer Konzentration von 5 mMol /l kam es zu einer unspezifischen Unterdrückung des Schutzes auch in der Kontrollgruppe.

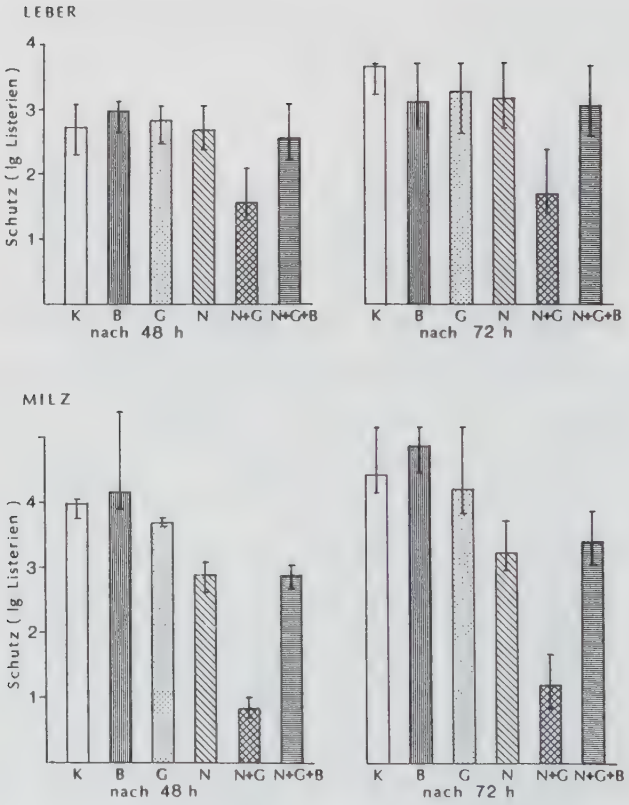

Abb.2. Einfluß der Membranmodifikation von Petls mit Nase, Gox und BH_4^- auf den adoptiv übertragenen Schutz in Leber und Milz nach 48 bzw. 72 h. Nase - Behandlung führte zu signifikanter Schutzabnahme in der Milz ($p < 0,01$), zusätzliche Inkubation mit Gox senkte den Schutz in der Milz gegenüber alleiniger Nase - Behandlung nochmals signifikant ($p < 0,01$). Auch der in der Leber meßbare Schutz wurde nach Nase + Gox - Inkubation signifikant verringert ($p < 0,01$). Die Gox - Wirkung war nach Reduktion mit BH_4^- reversibel.
B, BH_4^-; G, Gox ; N, Nase ; K, Kontrolle

3.1.3 Vergleich zwischen Behandlung mit Nase oder JO_4^- bzw. zwischen Behandlung mit Nase + Gox oder Nase + JO_4^-

Petls wurden mit Nase bzw. JO_4^- oder mit Nase + Gox bzw. mit Nase + JO_4^- inkubiert. Sowohl Behandlung mit Nase als auch Behandlung mit JO_4^- führte zu Abnahme des Schutzes in der Milz ohne Schutzveränderung in der Leber (Abb.3). Die durch JO_4^- - Behandlung bewirkten Veränderungen waren ausgeprägter : der Schutz in der Milz war signifikant schlechter als der von Nase - behandelten Zellen vermittelte Schutz.

Bei der Oxidation der nach Nase - Einwirkung freiwerdenden Gal - Reste (s.3.6) wirkten JO_4^- und Gox in gleicher Weise; nach JO_4^- - Oxidation war die Abnahme des Schutzes in der Milz ausgeprägter (aber nicht signifikant, s. Diskussion). Behandlung mit Nase + Gox führte zu signifikant schlechterem Schutz als Behandlung mit JO_4^- allein.

Die gegenüber den rein enzymatischen Modifikationen ausgeprägtere JO_4^- - Wirkung könnte rein quantitativ auf der Modifikation einer größeren Anzahl von Molekülen beruhen (vgl. 3.7).

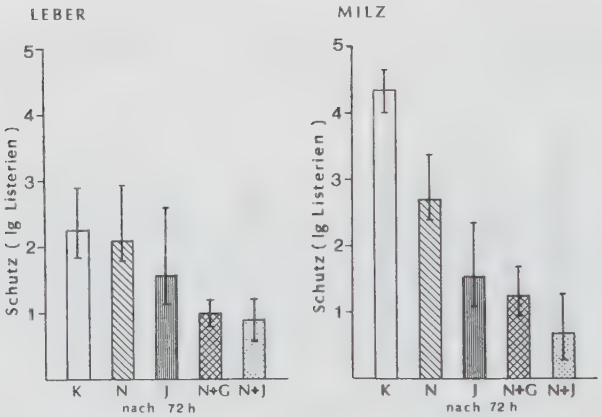

Abb.3. Vergleich des Einflusses der Membranmodifikation von Petls mit Nase gegenüber JO_4^- und Nase + Gox gegenüber Nase + JO_4^- auf den adoptiv übertragenen Schutz in Leber und Milz nach 72 h. JO_4^- - Behandlung reduzierte den in der Milz meßbaren Schutz stärker als Nase - Behandlung ($p < 0,01$). Eine tendenziell weitere Schutzverringerung wurde durch Inkubation mit Nase + Gox bzw. Nase + JO_4^- erreicht, diese beiden Modifikationen senkten auch den in der Leber meßbaren Schutz ($p < 0,01$). N, Nase ; J, JO_4^- ; K, Kontrolle

3.2 Konzentrationsabhängigkeit der gezeigten Effekte

In den bisherigen Versuchen wurde mit den in der Literatur angegebenen Konzentrationen der verwendeten Substanzen gearbeitet (Tabelle 1). Im Folgenden wurde untersucht, wel-

chen Einfluß Veränderungen der Substratkonzentrationen auf die Schutzübertragung haben.

3.2.1 Variation der JO_4^- - Konzentration

JO_4^- wurde in der ursprünglichen Konzentration von 0,5 mMol /l und in den Konzentrationen 0,1 und 1 mMol /l angewandt.

Mit steigender Konzentration erhielt man eine zunehmende Verringerung der Schutzleistung (Abb.4). Diese war in der Leber deutlich weniger ausgeprägt, führte aber in der höchsten Konzentration zu einem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. In der Milz wurde der Schutz bereits durch 0,1 mMol JO_4^- /l stark verringert (ca. 2 log - Einheiten) und nahm mit steigender Konzentration weiter kontinuierlich ab. Die Inkubation mit 1 mMol JO_4^- /l führte zum Anstieg der Zahl toter Zellen auf bis zu 10 % .

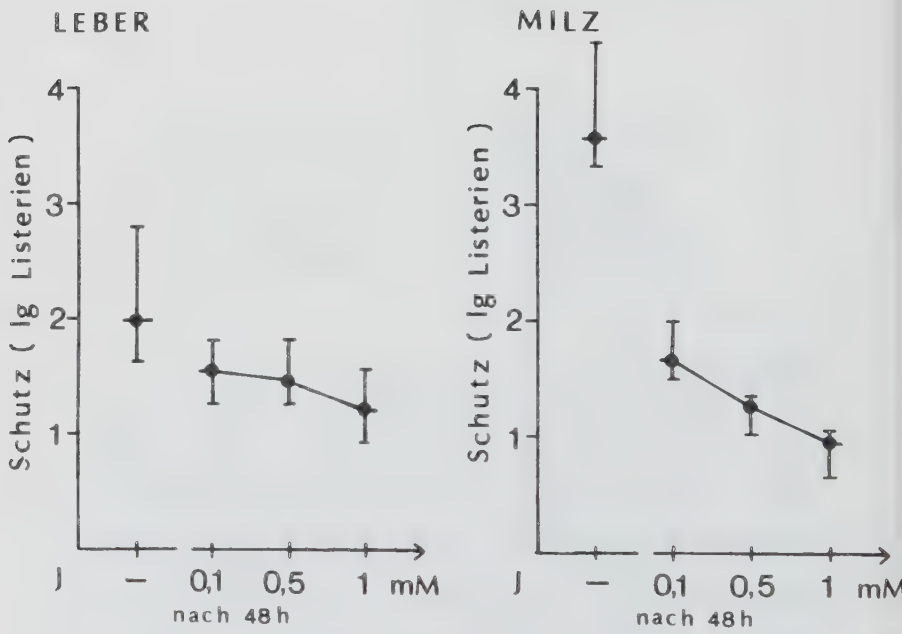

Abb.4. Adoptiv übertragbarer Schutz nach Membranmodifikation von Petls mit unterschiedlichen JO_4^- - Konzentrationen. Organentnahme 48 h nach Transfer. Mit steigenden JO_4^- - Konzentrationen fiel die Schutzleistung in der Leber und in der Milz, in der höchsten Konzentration war die Schutzabnahme auch in der Leber signifikant ($p < 0,01$). J, JO_4^-

3.2.2 Variation der Nase - Konzentration

Untersucht wurden Nase - Konzentrationen zwischen 0,02 und 0,1 U /ml. Die ursprünglich angewandte Konzentration hatte 0,1 U /ml betragen. In der Leber zeigte sich in keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe, Behandlung mit ansteigender Nase - Konzentration hatte also keinen Einfluß auf den in der Leber erreichbaren Schutz (Abb.5). In der Milz dagegen führten steigende Nase - Konzentrationen zu einer Abnahme des Schutzes; die Kurve zeigte Sättigungscharakter. In Konzentrationen zwischen 0,06 und 0,08 U /ml wurde ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle erreicht.

3.2.3 Variation der Gox - Konzentration bei konstanter Nase - Konzentration

Nase wurde in einer Konzentration angewandt, die selbst gerade noch keinen signifikanten Unterschied hervorrief (0,06 U Nase /ml). Die Gox - Konzentration wurde zwischen 0,3 und 1,2 U /ml variiert (ursprüngliche Konzentration : 1 U /ml).

Die Schutzwirkung wurde erwartungsgemäß stark reduziert,

eine Konzentrationsabhängigkeit war bei den angesetzten Konzentrationen jedoch weder in der Leber noch in der Milz zu erkennen (Abb.6). In einem anderen Experiment (nicht dargestellt) wurde bei konstanter Nase - Konzentration von 0,1 U/ml die Gox - Konzentration in vier Stufen zwischen 0,01 und 0,5 U /ml variiert. Auch in dieser niedrigen Konzentration konnte keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden.

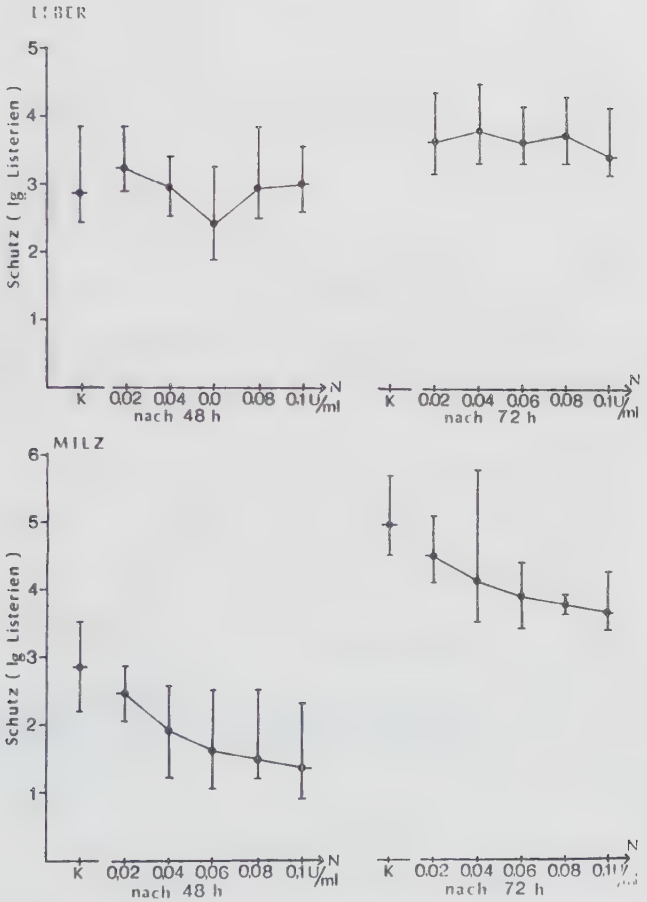

Abb.5. Schutzübertragung in Leber und Milz nach Membranmodifikation von Petls mit ansteigenden Nase - Konzentrationen. Organentnahme 48 und 72 h nach Zelltransfer. Eine signifikante Schutzverringerung in der Milz wurde im Konzentrationsbereich zwischen 0,06 und 0,08 U Nase /ml erreicht. Der Kurvenverlauf deutete auf einen Sättigungscharakter hin.
K, Kontrolle ; N, Nase

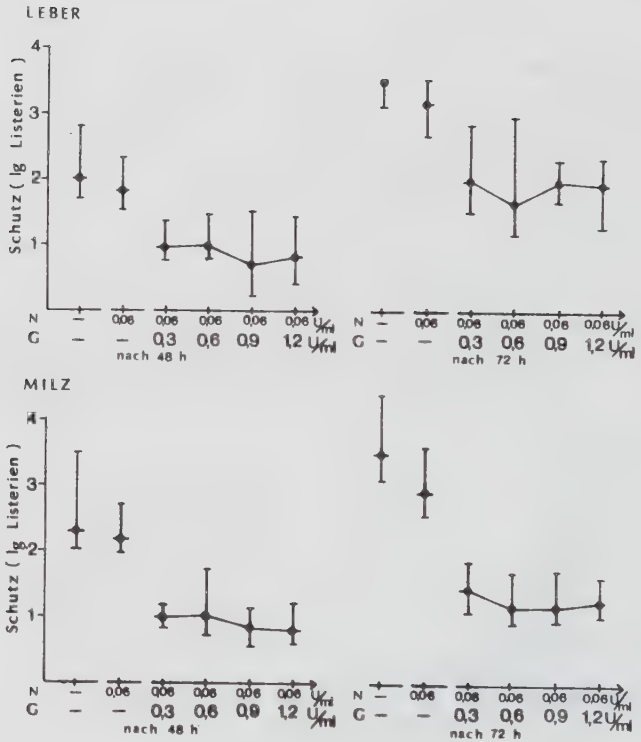

Abb.6. Adoptiv übertragbarer Schutz in Leber und Milz nach Membranmodifikation von Petls mit unterschiedlichen Gox - Konzentrationen bei konstanter Nase - Konzentration. Die gewählte Nase - Konzentration (0,06 U /ml) bewirkte allein keine signifikante Schutzverringerung. Zusätzliche Gox - Inkubation senkte den Schutz in Leber und Milz signifikant gegenüber der Kontrolle ($p<0,01$), eine Konzentrationsabhängigkeit war im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erkennbar.
N, Nase ; G, Gox

3.3 Infektion 24 h nach Zelltransfer

Nach Übertragung von T - Lymphozyten war Schutz gegen eine Listerieninfektion nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar (nicht dargestellt). Bei Listerieninfektion 24 h nach Zelltransfer war der erzielte Schutz bereits deutlich geringer als bei sofortiger Infektion. Unbehandelte Zellen bzw. Kontrollgruppen (Behandlung BH_4^- bzw. mit Gox allein) unterschieden sich auch bei späterer Infektion nicht voneinander, es wurde jedoch nur noch ein Schutz von ca. zwei log - Einheiten erreicht.

Nase - behandelte Zellen vermittelten bei späterer Infektion denselben Schutz wie unbehandelte Zellen, der Nase - Effekt war also in vivo reversibel. Die Abnahme des Schutzes nach zusätzlicher Oxidation mit Gox blieb jedoch auch bei späterer Infektion erhalten : die Schutzwirkung der Kontrollgruppe wurde in der Leber nicht erreicht (kein signifikanter Unterschied, jedoch bei insgesamt verringertem Schutz, s.o.); in der Milz blieb der Schutz signifikant verringert ($p < 0{,}01$).

Nach Reduktion mit BH_4^- war die Gox - Wirkung voll reversibel : es wurde derselbe Schutz wie nach Nase - Inkubation allein übertragen, d.h. bei Infektion 24 h nach Membranmodifikation und Transfer war kein Unterschied gegenüber der Kontrolle mehr nachweisbar (Abb.7).

Das Ergebnis nach Membranmodifikation mit JO_4^- glich dem nach Behandlung mit Nase + Gox : die Schutzwirkung blieb auch bei späterer Infektion verringert, in der Milz bestand weiterhin ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) (Abb.8).

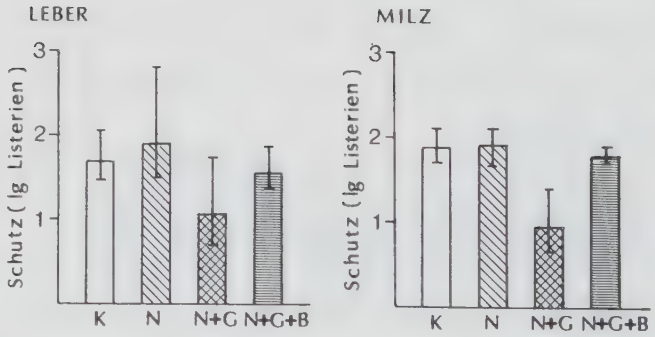

Abb.7. Adoptiv übertragener Schutz nach Membranmodifikation von Petls mit Nase, Nase + Gox und Nase + Gox + BH_4^- und Infektion 24 h nach Zelltransfer : Untersuchung der In vivo-Reversibilität der Schutzabnahme. Nach Nase - Behandlung war unter diesen Bedingungen keine Schutzverringerung mehr nachweisbar, während Behandlung mit Nase + Gox in vivo nicht spontan reversibel war.
N, Nase ; G, Gox ; B, BH_4^- ; K, Kontrolle

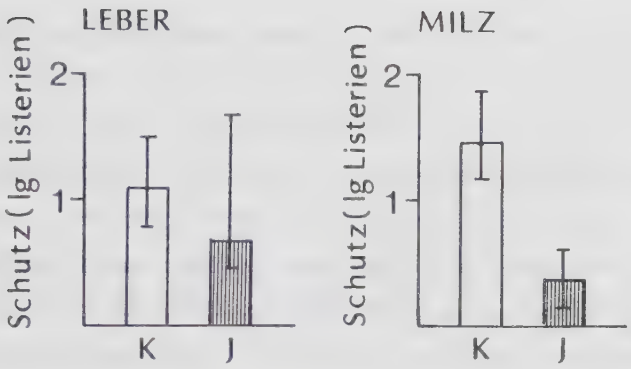

Abb.8. Adoptiv übertragener Schutz nach Membranmodifikation von Petls mit JO_4^- und Infektion 24 h nach Zelltransfer : Untersuchung der In vivo - Reversibilität der Schutzabnahme nach JO_4^- - Behandlung. Eine signifikante Schutzminderung in der Milz blieb auch unter diesen Bedingungen bestehen.
J, JO_4^- ; K, Kontrolle

3.4 Transfer von DTH gegen Listerienantigen

Um das Akkumulationsverhalten Listerien - immuner Petls in einem peripheren Entzündungsherd zu untersuchen,wurde nach Membranmodifikation und Zelltransfer (i.v.) eine DTH in der Hinterpfote des Versuchstiers ausgelöst.

Unbehandelte- sowie Kontrollzellen (BH_4^- - Behandlung allein) ergaben maximale Werte, Oxidation mit anschließender Reduktion ergab annähernd maximale Werte (Tabelle 2). Nase - Behandlung führte zur Abnahme der DTH, genauso verhielten sich - erwartungsgemäß - Zellen, die nach zusätzlicher Oxidation wieder reduziert worden waren (Inkubation mit Nase + Gox + BH_4^-). Nach Nase + Gox - Behandlung erhielt man eine stark reduzierte DTH. JO_4^- - Behandlung führte zu weitgehendem Ausfall der DTH. Dieser maximal negative JO_4^- - Effekt war nach den Ergebnissen der Schutzversuche nicht zu erwarten gewesen, während die DTH - Abnahme nach den übrigen Modifikationen dem Ausmaß der Schutzverringerung nach der entsprechenden Modifikation vergleichbar war.

Tabelle 2. Einfluß der Membranmodifikation L. monocytogenes - spezifischer Petls auf den systemischen DTH - Transfer[a].

Behandlung	DTH (0,1 mm) (Mittelwerte und Spannweiten)
Kontrolle	8,5 (7,0 - 9,0)
BH_4^-	8,0 (6,5 - 9,0)
Nase	5,0 (3,0 - 6,0)
Nase + Gox	2,5 (2,0 - 3,0)
Nase + Gox + BH_4^-	5,5 (5,0 - 6,5)
JO_4^-	1,0 (1,0 - 1,0)
JO_4^- + BH_4^-	7,0 (5,5 - 9,0)

a) Behandelte Zellen wurden i.v. transferriert und gleichzeitig wurde eine DTH durch s.c. - Gabe von Listerienantigen ausgelöst

3.5 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Zusammengefaßt ergab sich eine negative Beeinflussung von Schutzfähigkeit und DTH - Übertragbarkeit durch Membranmodifikation :mäßige Schutzverringerung in der Milz nach Nase -, stärkere Verminderung nach JO_4^- - Behandlung, weitere Schutzabnahme in der Milz und auch in der Leber durch Modifikation mit Nase + Gox bzw. Nase + JO_4^-. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bezüglich der Auslösbarkeit einer DTH mit einer Ausnahme : die stärkste Reduktion der DTH ergab sich nicht nach Inkubation mit Nase + Gox, sondern nach JO_4^- - Behandlung allein. In vivo spontan reversibel war nur der Effekt der Nase - Behandlung. Die Folgen der JO_4^- - und Gox - Modifikation konnten jedoch durch sukzessive In vitro - Inkubation mit BH_4^- aufgehoben werden, so daß wieder Normalwerte erreicht wurden. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte im verwendeten Konzentrationsbereich nur für Nase und für JO_4^- gefungen werden.

3.6 Einfluß der Membranmodifikation auf das Migrationsverhalten von Petls

Um die zum Teil gefundenen Verminderungen des über-

tragenen Schutzes erklären und genauer differenzieren zu können, sollte untersucht werden, inwieweit sich membranmodifizierte Zellen in ihrer Fähigkeit, am Infektionsort zu akkumulieren, von nicht modifizierten Zellen unterscheiden (Transfer nach Membranmodifikation und radioaktiver Markierung mit ^{51}Cr, gleichzeitige Listerieninfektion).

Tabelle 3 zeigt den Prozentsatz der in Leber und Milz wiedergefundenen Radioaktivität. Rund ein Drittel der Aktivität der Kontrollgruppe fand sich über den gesamten Meßzeitraum in der Leber. In der Milz wurde ca. ein Viertel der in der Leber vorhandenen Aktivität erreicht. Dies war mehr, als nach einer passiven Verteilung zu erwarten gewesen wäre. - Uber den Verbleib der übrigen Aktivität konnte keine Aussage getroffen werden.

Nase - Behandlung führte kurz nach Injektion zu einem starken Anstieg der Aktivität in der Leber; die Aktivität blieb innerhalb der ersten 24 h hoch, fiel dann jedoch fast auf Kontrollwerte ab. Die Aktivität in der Milz war zunächst gering, erreichte aber nach 24 h ein höheres Niveau, ein Unterschied zur Kontrolle blieb bestehen. Die erzielte Umverteilung war wiederum höher, als einer passiven Verteilung entsprechen würde.

Nase + Gox - behandelte Zellen zeigten in der Leber eine ähnliche Verteilung wie Kontrollzellen, nach 24 h war allerdings eine stärkere Kumulation nachweisbar. In der

Milz konnte zu allen Zeitpunkten nur geringe Aktivität gemessen werden. Nach 24 h war eine geringe (absolute) Aktivitätszunahme zu beobachten.

Oxidation mit JO_4^- führte zu einer Aktivitätszunahme in der Leber (ähnlich wie Nase - Behandlung), der Aktivitätsgipfel wurde aber erst nach 24 h erreicht (analog zu Nase + Gox) und fiel nur langsam ab : die Aktivität lag nach 48 h noch deutlich höher als in der Kontrollgruppe. In der Milz fand sich - wieder analog zu Nase - Behandlung - zunächst nur eine geringe Radioaktivität, die aber auch im weiteren Verlauf nicht wesentlich zunahm.

In der Kontrollgruppe (ohne Membranmodifikation) waren insgesamt weniger als 50 % der verabreichten Aktivität nachweisbar. Unter Bedingungen, die offenbar zu einer Akkumulation führten, waren fast 70 % der verabreichten Aktivität meßbar (Nase - , JO_4^- - Behandlung). Die nach Behandlung mit Nase + Gox nachweisbare Gesamtaktivität erreichte nur nach 24 h höhere Werte als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 3. Organakkumulation ^{51}Cr - markierter L. monocytogenes - spezifischer T - Lymphozyten [b)]

	% ^{51}Cr					
	Leber			Milz		
Modifikation	1h	24h	48h	1h	24h	48h
Kontrolle	34,6	37,1	32,5	8,5	9,5	9,3
Nase	65,7	59,8	38,5	3,7	6,3	6,7
Nase + Gox	35,3	46,0	29,0	1,9	3,4	3,0
JO_4^-	45,6	61,3	48,7	3,6	4,2	4,4

b) Radioaktive Markierung von Petls mit ^{51}Cr. Nachweis der Aktivität in Milz und Leber nach adoptivem Transfer und gleichzeitiger Listerieninfektion. Organentnahme nach 1, 24 und 48 h. Angabe des Verhältnisses (%) der insgesamt verabreichten zur wiedergefundenen Aktivität

3.7 Analyse der molekularen Veränderungen

Die molekularen Veränderungen sind - am Beispiel einer (terminalen) N - acetyl - Ns mit präterminaler Gal in Abbildung 9 schematisch dargestellt (nach Ashwell und Morell, 1974; Schauer, 1979). JO_4^- (Reaktionsweg 1 und 2) greift oxidativ die Seitenkette C_7 - C_9 der Ns an. Unter Abspaltung von

C_1 - bzw. C_2 - Bruchstücken entsteht anstelle der endständigen Hydroxylgruppe an C_9 eine Aldehydgruppe an C_8 bzw. C_7 . Reduktion mit BH_4^- führt zur Bildung von C_8 - bzw. C_7 - Analogen der ursprünglichen Ns. Nase spaltet terminale Ns ab (Reaktionsweg 3), dies führt u.a. zum Auftreten freier Gal - Reste mit endständiger Hydroxylgruppe (analog der Ns). Durch Oxidation mit Gox entsteht eine Aldehydgruppe an C_6 . Nach Reduktion mit BH_4^- erhält man wieder die ursprüngliche Gal.

80 % des Gesamt - Ns - gehaltes der Zellen werden durch JO_4^- oxidiert. C_7 - und C_8 - Analoge entstehen im Verhältnis 1 : 1 (Kaufmann et al., 1981; Ashwell und Morell, 1974). Durch Nase werden 48 % der Gesamt - Ns abgespalten. Diese Ns bestehen zu 70 % aus N - glykolyl - und zu 30 % aus N - acetyl - Ns (Kaufmann et al., 1981).

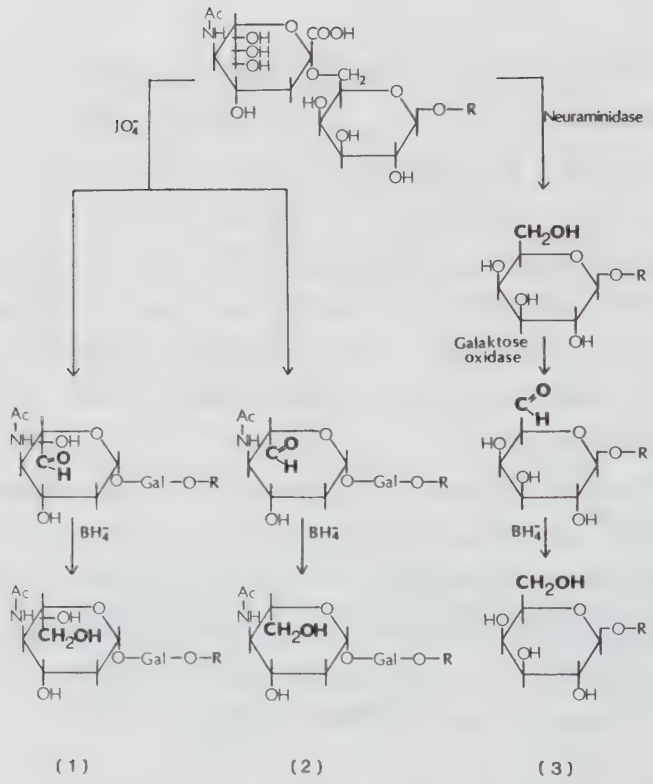

Abb.9. Schema der In vitro - Modifikation der Zellmembran : Oxidation terminaler Ns durch JO_4^- und Bildung von Aldehydgruppen an C_8 (Reaktionsweg 1) bzw. C_7 (Reaktionsweg 2) unter Abspaltung von C_1 - bzw. C_2 - Bruchstücken. Anschließende Reduktion mit BH_4^- zu C_7 - bzw. C_8 - Analogen der ursprünglichen Ns. Abspalten der Ns mit Nase (Reaktionsweg 3), Oxidation der freigewordenen Gal an C_6 zum Aldehyd, Restitution zur Gal durch Reduktion mit BH_4^- .
R = freies Ende der äußeren Kohlenhydratkette der Glykokalix

4 Diskussion

Durch Membranmodifikation Listerien - immuner Petls wurde die Rolle endständiger Zuckermoleküle der Zelloberfläche bei der adoptiven Immunisierung untersucht : durch Nase - oder JO_4^- - Behandlung kam es zur Schutzabnahme in der Milz und Zellanhäufung in der Leber (ohne zusätzliche Schutzverstärkung), wobei JO_4^- - Behandlung stärkere Effekte zeigte. Nase + Gox führte zu einer weiteren Schutzabnahme in der Milz und zusätzlich auch zur Schutzabnahme in der Leber bei nur geringer, vorübergehender Zellakkumulation. Behandlung mit Nase + JO_4^- hatte keinen nachweisbar stärkeren Effekt als Behandlung mit Nase + Gox. Keine der eingesetzten Modifikationen war somit in der Lage, eine Verbesserung des Immunisierungsverhaltens zu bewirken.

Ähnliche Verhältnisse fanden sich bei der Auslösung einer DTH : Nase - behandelte Zellen übertrugen eine geringere DTH als Kontrollzellen; zusätzliche Gox - Behandlung reduzierte die DTH weiter. Im Gegensatz zu den Schutzversuchen war jedoch der stärkste negative Effekt mit fast vollständigem Ausfall der DTH nach JO_4^- - Behandlung festzustellen. Die Fähigkeit zur DTH - Übertragung wie auch das geänderte Migrationsverhalten Listerien - immuner Petls entsprachen damit den für T - Zellen mit Spezifität für Schaferythrozyten beschriebenen Eigenschaften (Kaufmann et al., 1981).

Wurde eine Infektion 24 h nach Zelltransfer gesetzt, dann schützten Nase - behandelte Zellen genauso gut wie unbehandelte Zellen. Entsprechend zeigte sich im Migrationsversuch eine Angleichung an die Kontrollgruppe, so daß eine In vivo - Resynthese von Ns anzunehmen ist (nach Nase - Behandlung findet in vitro eine Ns - Resynthese innerhalb von Stunden statt, Brinckerhoff und Luhrin, 1974). Demgegenüberblieben nach zusätzlicher Gox - bzw. JO_4^- - Inkubation Differenzen des übertragenen Schutzes auch bei Infektion 24 h nach Transfer bestehen. Unter diesen Bedingungen dürfte daher eine In vivo - Restitution nicht stattgefunden haben. Die biologischen Auswirkungen der beiden oxidativen Modifikationen waren jedoch nach In vitro - Reduktion mit BH_4^- reversibel (gleiches biologisches Verhalten wie Kontrollzellen). Eine unspezifische Zellschädigung ist aufgrund dieser Daten sowie der mikroskopischen Vitalitätsprüfung (Exklusion von Trypanblau) auszuschließen. Daß bei verspäteter Infektion der meßbare Schutz insgesamt abnahm , dürfte Ausdruck der relativ kurzen Überlebenszeit von Effektorlymphozyten sein.

Das Ausmaß des übertragenen Schutzes war einerseits abhängig von der Anzahl übertragener Zellen, andererseits von der Anzahl übertragener Listerien. Wurden Zellempfänger schon 24 h vor Zelltransfer infiziert (Experimente nicht dargestellt), so waren auch unbehandelte Zellen nicht in

der Lage, einen signifikanten Schutz zu vermitteln (dies wäre vergleichbar der Applikation eines Mehrfachen des üblichen Listerien - Inokulums). Geringere Zellzahlen in der Milz nach Membranmodifikation könnten den geringeren Schutz in diesem Organ erklären. Da jedoch eine Zellakkumulation in der Leber nicht zu einer Schutzverbesserung führte und da alle Modifikationen eine Abnahme der DTH bewirkten, muß zusätzlich eine Beeinträchtigung der Auseinandersetzung mit dem Antigen in Betracht gezogen werden.

Nase - Behandlung erreicht viel weniger Ns als JO_4^- - Behandlung, dies dürfte sich aus der Enzymspezifität erklären lassen (Ashwell et al., 1974) : nicht alle prinzipiell endständigen Ns werden durch Nase abgespalten. Die mit steigender JO_4^- - Konzentration parallel gehende Schutzverringerung könnte auf zusätzlichen Veränderungen wie z.B. Aufbrechen der Rinstruktur von Zuckermolekülen beruhen (Novogrodski und Katchalski, 1972) und nicht Ausdruck einer stärkeren Oxidation von Ns gewesen sein. Ein Sättigungscharakter war bei dieser rein chemischen Modifikation nicht zu erwarten gewesen.

Die Wirkungslosigkeit alleiniger Gal - Inkubation spricht dafür, daß im Normalzustand keine freien und für biologische Funktionen relevanten Gal - Moleküle vorliegen. Entsprechende Verhältnisse dürften auch für BH_4^- gelten :

reduzierbare, biologisch relevante Zelloberflächenstrukturen sind nicht anzunehmen.

Membranmodifizierte Zellen zeigten das aus der Literatur sowohl für Glykoproteine (Ashwell und Morell, 1974) als auch für Zellen bekannte Migrationsverhalten (Zatz et al., 1972 ; Woodruff und Gessner, 1969). Es ist daher anzunehmen, daß diesen Phänomenen ähnliche biologische Vorgänge zugrunde liegen.

Ns - defiziente Glykoproteine werden ebenso wie Ns - defiziente Lymphozyten in vitro an ein spezifisches Hepatozytenmembranprotein mit Rezeptoreigenschaften gebunden (Kolb et al., 1978) und eine analoge Bindung ist auch in den vorliegenden Experimenten anzunehmen. Dagegen werden Erythrozyten nach Ns - Abspaltung an Kupfersche Sternzellen (und an andere Makrophagen) gebunden (Schlepper - Schäfer et al., 1980). Wä rend die Plasmahalbwertszeit von Glykoproteinen und Erythrozyten offensichtlich von der Anwesenheit terminaler Ns abhängt (Müller et al., 1981), gilt dies für kernhaltige, zur Resynthese befähigte Zellen nicht, wie aus der spontanen Reversibilität und der nur vorübergehenden Akkumulation in der Leber geschlossen werden kann.

Die Akkumulation in der Leber nach JO_4^- - Modifikation weist gegenüber der Nase - Behandlung einen anderen zeitlichen Verlauf auf mit einem Maximum nach 24 h (bei gleichzeitig länger anhaltender Akkumulation). Dies spricht gegen

eine spezifische Rezeptorbindung und für andersartige Wechselwirkungen. Entsprechend dem Modell von Novogrodski und Katchalski (1973) müssen hier chemisch - physikalische Bindungen in Form von Schiffschen Basen in Betracht gezogen werden.

Worauf beruht nun die verminderte Schutz - bzw. DTH - Übertragbarkeit ?

Ns - defiziente Lymphozyten werden an Hepatozyten gebunden. Eine Listerieninfektion spielt sich dagegen primär im mononukleären Phagozytensystem, d.h.u.a. den Kupferschen Sternzellen, ab. Trotz der engen Nachbarschaft beider Prozesse findet eine uneingeschränkte Auseinandersetzung der Lymphozyten mit Antigen - präsentierenden Makrophagen zunächst nicht statt. Der entscheidende Faktor scheint die reversible Rezeptorbindung zu sein. Die für diese spezifische Bindung verantwortlichen Lymphozytenmembranstrukturen sind freie Gal - Moleküle. Modifikation dieser Moleküle durch Gox beseitigt sofort die Rezeptorbindung, führt aber gleichzeitig zu qualitativ neuen Effekten : trotz anscheinend weitgehend ungehinderter Rezirkulation ist die Antigenreaktivität (Schutz, DTH) stark vermindert.

JO_4^- - Modifikation nimmt eine Mittelstellung ein : einerseits kommt es zur Modifikation von Ns und zur Akkumulation in der Leber analog der Behandlung mit Nase. Andererseits bestehen Parallelen mit der Inkubation mit Nase + Gox :

(1) in beiden Fällen handelt es sich um Oxidationen ,
(2) beide sind mit einer starken Reduktion der Schutzleistung verbunden und (3) beide sind in vivo nicht reversibel.

Zur Erklärung dieser verschiedenen Effekte müssen mindestens zwei Wirkungsmechanismen postuliert werden :
(1) Modifikation oder Abspaltung von Ns führt zur Aufhebung der freien Rezirkulation; die Bindung in der Leber dominiert daher über die Fähigkeit zu aktiver Migration und über die dadurch ermöglichte Schutz - bzw. DTH - Vermittlung.
(2) Änderungen des Oxidations - Reduktionszustandes beeinträchtigen dagegen primär die Auseinandersetzung der Lymphozyten mit dem Antigen (d.h. Schutz - und DTH - Wirkung) bei erhaltener Rezirkulation.

Mit diesem Modell sind alle experimentellen Schutz - und DTH - Befunde erklärbar. Danach beruht z.B. die auffallend geringe DTH nach JO_4^- - Inkubation auf der vorherrschenden, langfristigen Zellakkumulation in der Leber bei gleichzeitig verminderter Auseinandersetzungsfähigkeit mit dem Antigen. Die Ursachen dieser mangelnden Auseinandersetzungsfähigkeit mit dem Antigen sind mit dem vorliegenden Untersuchungsmodell allerdings nicht klärbar.

Bei In vitro - Experimenten bewirkte Membranmodifikation von T - Lymphozyten mit Nase + Gox bzw. JO_4^- u.a. Blastenbildung und Zellproliferation sowie Aktivierung zytotoxischer Funktionen (Novogrodski und Katchalski, 1972, 1973). Auch

Behandlung mit Nase allein kann zur mitogenen Transformation führen (Semenzato et al., 1977). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Hepatozytenmembranrezeptor mitogen wirkt (Novogrodski und Katchalski, 1977). Andererseits wurde beschrieben, daß Behandlung von Milzzellen mit Nase + Gox zu keiner erhöhten Zytotoxizität gegenüber Alloantigenen führt und dies wurde mit der Induktion von Suppressormechnismen erklärt (Kuppers und Henney, 1979). Ferner gibt es in der Literatur Hinweise, daß eine Concanavalin - A - Stimulation Listerien - immuner T - Zellen in vitro deren Schutzvermittlung in vivo erhöht (Barry und Hinrichs, 1982).

Die nach allen Membranmodifikationen zu beobachtende Abnahme von Schutz - und DTH - Übertragbarkeit spricht gegen eine im Endeffekt immunstimulierende In vivo - Wirkung der Membranmodifikation. Ns - Abspaltung ist spontan reversibel. Dagegen bleibt die weitgehende Irreversibilität der biologischen Effekte nach oxidativer Membranmodifikation ungeklärt. Bindung in der Leber allein verhindert nicht generell die Membranresynthese (s. Nase - Behandlung). Für ein Absterben oxidativ modifizierter Zellen in vivo besteht kein Anhalt, in diesem Fall wäre durch Zellabbau ein Radioaktivitätsanstieg im Phagozytensystem, also auch in der Milz, zu erwarten gewesen. Ob zur Erklärung der Folgen einer oxidativen Membranmodifikation andere der oben beschriebenen In vitro - Wirkungen (z.B. Blastenbildung) herangezogen werden müssen, muß offen bleiben.

Die durch JO_4^- - Modifikation bewirkte Zellakkumulation in der Leber geht mit der Bildung einer großen Zahl von Aldehydgruppen und möglicherweise darauf beruhenden physikalisch - chemischen Wechselwirkungen einher. Ein spezifischer Rezeptor für eine Bindung über Schiffsche Basen ist nicht erforderlich. Demgegenüber ist eine Bindung Ns - defizienter Lymphozyten an einen für terminale Gal spezifischen Rezeptor anzunehmen. In jedem Fall unterstreichen beide Vorgänge die Bedeutung intakter terminaler Ns für die freie Zirkulationsfähigkeit, ohne die Schutz- und DTH - Übertragbarkeit nicht möglich sind. Es ließen sich aber Bedingungen angeben, unter denen keine signifikante Nase - Eigenwirkung bestand; anschließende Inkubation mit Gox bewirkte jedoch sofort erhebliche Veränderungen des biologischen Verhaltens. Die Anzahl der durch diese Modifikation gebildeten Aldehydgruppen war sicher vergleichsweise gering und für eine physikalisch - chemische Bindung nicht ausreichend. Aus dem gleichen Grund ist auch nur eine geringe Änderung des Oxidations - Reduktionszustandes der Zelloberfläche anzunehmen. Trotzdem war die Schutzwirkung nach Nase + JO_4^- - gegenüber Nase + Gox - Behandlung nicht eindeutig unterschieden, obwohl nach JO_4^- - Behandlung mit einer viel ausgeprägteren Veränderung des Oxidations - Reduktionszustandes zu rechnen war. Die gezielte Modifikation präterminaler Gal ist also biologisch viel spezifischer und wirkungsvoller.

Für die T -zellabhängige Infektionsabwehr gegen fakultativ intrazelluläre Bakterien folgt aus diesen Untersuchungen : definierte terminale Kohlenhydratmoleküle und der Oxidations - Reduktionszustand der Zelloberfläche sind für das Migrationsverhalten sowie die Schutz - und DTH - Übertragbarkeit verantwortlich, wobei eine besondere Bedeutung präterminalen Galaktosemolekülen zukommt.

5 Zusammenfassung

Der Einfluß der biochemischen Modifikation terminaler Kohlenhydratmoleküle der Zelloberfläche L. monocytogenes - immuner T - Zellen auf die biologische Aktivität dieser Zellen wurde untersucht.

Abspalten von Neuraminsäuren mit Neuraminidase (aus V. cholerae) bewirkte - abhängig von der Anzahl abgespaltener Neuraminsäuren - Zellretention in der Leber und Schutzverringerung in der Milz; Oxidation der Neuraminsäuren mit JO_4^- wirkte ebenso, jedoch waren Schutzverringerung und Zellretention ausgeprägter. Eine sehr starke Abnahme des Schutzes in der Milz und deutliche Verringerung in der Leber wurde durch Oxidation der nach Neuraminsäureabspaltung freiwerdenden Galaktosereste erreicht. Dieser Effekt war hochspezifisch, da offensichtlich bereits durch Oxidation einer geringen Anzahl von Galaktoseresten diese starke Schutzabnahme eintrat ohne nachweisbare Zellretention bzw. bei uncharakteristischem Migrationsverhalten. Oxidative Membranmodifikation war in vivo nicht reversibel, konnte aber durch In vitro - Reduktion mit BH_4^- rückgängig gemacht werden. Abspalten von Neuraminsäuren war in vivo spontan reversibel.

Jede Art der Membranmodifikation führte zu verminderter Schutzleistung bzw. DTH - Übertragbarkeit. Als Erklärung sind zwei verschiedene Mechanismen zu fordern : einerseits Zellre-

tention in der Leber, die die Auseinandersetzung mit dem Antigen in anderen Lokalisationen verhinderte ; andererseits direkte Beeinträchtigung der Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Antigen trotz unbehinderter Rezirkulation.

Es wird gefolgert, daß die Art und der Oxidations - Reduktionszustand oberflächlicher Membrankohlenhydrate für das Immunisierungs - und Migrationsverhalten von entscheidender Bedeutung sind. Abspaltung und auch Oxidation der Neuraminsäuren scheint stärker mit der unbehinderten Migrationsfähigkeit zu interferrieren, Oxidation präterminaler Galaktosereste besitzt eine besondere Bedeutung für die direkte Auseinandersetzung mit dem Antigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ashwell G.,Morell A.G.: The role of the surface carbohydrates in the hepatic recognition of circulating glycoproteins. Adv.Enzymol.41, 99 (1974)

2. Ashwell G.et al.,Morell A.G.et al.: The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglykoproteins. J.Biol.Chem.249, 5536 (1974)

3. Barry R.A.,Hinrichs D.J.: Enhanced adoptiv transfer of immunity to Listeria monocytogenes after in vitro culture of murine spleen cells with Concanavalin A. Infect.Immun.35, 560 (1982)

4. Brinckerhoff C.E.,Luhrin M.: Sialic acid deficient tumor cells: Inhibition of sialoglykoprotein synthesis by Emetine. J.Natl.Cancer Inst.53, 567 (1974)

5. Deman J.J.,Bruyneel E.A.,Marell M.M.: A study of the mechanism of intercellular adhesion. J.Cell.Biol.60, 641 (1974)

6. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7.Aufl.1975

7. Droege W.,Singh P.P.,Lüderitz F.: Surface carbohydrate composition of murine thymocytes and of lymph node cells from normal and athymic mice. Z.Immun.-Forsch.154, 243 (1978)

8. Ferguson R.,Anderson S.M.,Schmidtke R.J.,Simmons R.L.: Effekt of vibrio cholerae neuraminidase on the generation of cell-mediated cytotoxicity in vitro. J.Immunol.117,2150 (1976)

9. Froese G.,Berczi I.,Sehon A.H.: Neuraminidase-induced enhancement of tumor groth in mice. J.Natl.Cancer Inst.52, 1905 (1974)

10. Hahn H.,Kaufmann S.H.E.: The role of cell-mediated immunity in bacterial infections. Rev.Inf.Dis.3, 1221 (1981)

11. Hughes R.C.: The complex carbohydrates of cell surfaces and their biological roles. Essays Biochem.11, 1 (1975)

12. Hughes R.C.: Membran glycoproteins. Butterworth, London, 1976

13. Immich H.: Medizinische Statistik. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1974

14. Jancik J.,Streicher H.J.: Influence of membrane - bound N-acetylneuraminic-acid on the survival of erythrocytes in man. Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.356, 1327 (1975)

15. Julius M.H., Simpson E., Herzenberg L.A.: A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes.
Eur.J.Immunol.3, 645 (1973)

16. Kaufmann S.H.E., Hahn H.: Biological functions of T-cell lines with specificity for the intracellular bacterium Listeria monocytogenes in vitro and in vivo.
J.Exp.Med.155, 1754 (1982)

17. Kaufmann S.H.E., Respondek M., Wos B., Schauer R., Hahn H.: Biological activities and migratory properties of Listeria-specific T-lymphocytes depend on the reduction/oxidation state of the cell surface.
In:Glycoconjugates (Eds.Schauer R., Boer P., Buddecke E., Kramer, M.F., Vliegenhart J.F.G., Wiegand H.),
Thieme Verlag, Stuttgart, 1979

18. Kaufmann S.H.E., Schauer R., Hahn H.: Carbohydrate surface constituents of T-cells mediating delayed-type-hypersensitivity that control entry into sites of antigen deposition.
Immunbiol.160, 184 (1981)

19. Kaufmann S.H.E., Simon M.M., Hahn H.: Specific Lyt 123 T-cells are involved in protection against Listeria monocytogenes and in delayed-type-hypersensitivity to listerial antigens.
J.Exp.Med.150, 1033 (1979)

20. Kolb H., Kriese H., Kolb-Bachofen V., Kolb H.A.: Possible mechanismens of entrapement of neuraminidase treated lymphocytes in the liver.
Cell.Immunol.40, 457 (1978)

21. Köttgen E., Bauer C.H., Reutter W., Gerok W.: Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glykoproteinen.
Klin.Wochenschr.57, 151 (1979)

22. Kuppers R.C., Henney C.S.: The effects of neuraminidase and galaktose oxidase on murine lymphocytes.
J.Immunol.122, 1834 (1979)

23. Küster J.M., Schauer R.: Phagocytosis of sialidase-treated rat erythrocytes : Evidence for a two step mechanism.
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.362, 1507 (1981)

24. Mackeness G.B.: Cellular resistence to infection.
J.Exp.Med., 116, 381 (1962)

25. Mackeness G.B.: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo.
J.Exp.Med. 29, 973 (1969).

26. Mehrishi J.N., Zeiller K.: Surface molecular components of T and B lymphocytes.
Eur.J.Immunol.4, 474 (1974)

27. Müller E.,FrancoM.W.,Schauer R.: Involvement of membrane galaktose in the in vivo and in vitro sequestration of desialylated erythrocytes.
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.362, 1615 (1981)

28. North,R.J.,Spitalny G.: Inflammatory lymphocytes in cell-mediated antibakterial immunity : Factors governing the accumulation of mediator cells in peritoneal exsudates.
Infect.Immun. 10, 489 (1974)

29. Novogrodski A.,Ashwell G.: Lymphocyte mitogenesis induced by a mammalian liver protein that specifically binds desialylated glycoproteins.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 676 (1977)

30. Novogrodski A.,Katchalski E.: Membrane site modified on induction of the transformation of lymphocytes by perjodate.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 3207 (1972)

31. Novogrodski A.,Katchalski E.: Induction of lymphocyte transformation by sequential treatment with neuraminidase and galaktose oxidase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 1824 (1973)

32. Novogrodski A.: Selective activation of mouse T and B lymphocytes by perjodate, galaktose oxidase and soybean agglutinin.
Eur.J.Immunol.4, 646 (1974)

33. Piessens W.F.: Increased binding and killing of neuraminidase galaktoseoxidase-treated tumor cells by normal macrophages.
J.Immunol.119, 167 (1977)

34. Reutter W.,Köttgen E.,Bauer C.,Gerok W.: Biological significance of sialic acids.
Cell Biology Monographs, Vol.10, 263 (1982)

35. Rosenberg S.A.: Murine autoantibodies to a cryptic membran antigen.
J.Natl.Cancer Inst.52, 1151 (1974)

36. Schauer R.: Characterisation of sialic acids.
In: Methods in enzymology 50, Colowick S.P.,Kaplan N.O.,eds, Academic Press 64 (1979)

37. Schlepper-Schäfer J.,Kolb-Bachofen V.,Kolb H.: Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupfer cells.
Biochem.J. 186, 827 (1980)

38. Semenzato G.,Sarasin D.,Amadori G.,Gasparotto G.: Mitogenic action of neuraminidase.
Experientia 33, 1520 (1977)

39. Weiss L.,Glaves D.,Waite D.A.: The influence of host immunity on the arrest of circulating cancer cells, and its modificatio by neuraminidase.
Int.J.Cancer 13, 850 (1974)

40. Woodruff J.J., Gesner B.M.: The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes.
J.Exp.Med.129. 551 (1969)

41. Zatz M.M., Goldstein A.L., Blumenfeld O.O., White A.:
Regulation of normal and leucaemic lymphocyte transformation and recirculation by sodium perjodate oxidation and sodium borhydrate reduction.
Nature New Biol.240, 252 (1972)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof.Dr. Hahn, der mir Laborplatz und Arbeitsmittel bereitwillig zur Verfügung gestellt hat. Ganz besonders herzlich danken möchte ich Herrn Priv.Doz. Dr. Kaufmann für Überlassung des Themas, Betreuung der Arbeit und zahlreiche fachliche Hilfestellungen. Ferner danke ich Herrn Prof.Dr.Schauer, Kiel, für die biochemische Analyse.

Lebenslauf

Geburt:	in Berlin	23.7.1956
Eltern:	Dr.med.Georg Respondek und	
	Dr.med.Gisela Respondek, geb. Barzel,	
	Ärzte für Allgemeinmedizin	
Familien-stand :	verheiratet mit	
	Birgit Wos - Respondek, Ärztin	1983
Schule:	St.Alfons Grundschule, Berlin	1963 - 1967
	Canisius - Kolleg	
	(humanistisches Gymnasium)	1967 - 1975
Abitur:	Canisius - Kolleg, Berlin	Juni 1975
Studium:	der Medizin an der	
	Freien Universität Berlin	WS 75/76 - SS 82
Approbation:		Mai 1982
Jetzige Tätigkeit:	Assistenzarzt am	
	Zentrum für Innere Medizin,	
	Katharinenhospital, Stuttgart	ab Juli 1982